

**Характеристика внеклеточных везикул, продуцируемых клетками
нейробластомы мыши Neuro2a с различным уровнем экспрессии урокиназы и
рецептора урокиназы**

Научный руководитель – Сёмина Екатерина Владимировна

Булякова Т.Р.¹, Рысенкова К.Д.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия, *E-mail: bu.tai@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биологической и медицинской химии, Москва, Россия, *E-mail: Karina_ry@mail.ru*

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой мембранные структуры, несущие биологически активные молекулы (белки, микроРНК и мРНК) [1]. Среди ВВ выделяют экзосомы (30-100 нм), микровезикулы (100-1000 нм) и апоптотические тельца (1-5 мкм). В настоящее время научный интерес представляет поиск ключевых молекул в составе ВВ, которые служат для передачи информации между клетками опухоли и клетками стромы, и тем самым модулируют опухолевый рост [2]. В дальнейшем такие молекулы могут иметь потенциальное значение в качестве диагностического маркера или терапевтической мишени.

Известно, что высокий уровень экспрессии урокиназы (uPA) и ее рецептора (uPAR) ассоциирован с развитием опухолей и метастазов, что указывает на перспективность урокиназной системы для подавления роста опухоли. Ранее в нашей лаборатории было показано, что CRISPR/Cas9 нокаут uPAR значительно снижает пролиферацию клеток Neuro2a и запускает в них апоптоз [3]. Целью настоящего исследования стало охарактеризовать ВВ, продуцируемые клетками Neuro2a с различным уровнем экспрессии белков урокиназной системы. В работе использовали клетки дикого типа, также с гиперэкспрессией, подавлением uPA и нокаутом uPAR.

Используя проточную цитометрию в сочетании с обработкой детергентом Triton X-100 мы показали мембранную природу исследуемых ВВ, выделяемых из клеток Neuro2a. При этом на фоне гиперэкспрессии uPA в Neuro2a клетках секреция ВВ возрастает, а также изменяется их состав: число экзосом уменьшается в 1,5-2 раза, однако на 10-15% увеличивается число микровезикул по сравнению с везикулами, получаемыми из клеток Neuro2a дикого типа (контроль). При подавлении экспрессии uPA и при нокауте гена uPAR происходит снижение секреции экзосом (и составляет 35,94% и 37,46%, соответственно) по сравнению контролем (52,73%). Далее методом иммуноблоттинга мы оценили экспрессию специфичных для везикул маркеров. Мы установили, что ВВ содержат маркеры экзосом ALIX и CD63, а в образцах везикул, полученных из клеток Neuro2a с гиперэкспрессией uPA, содержится урокиназа. С помощью электрофореза нуклеиновых кислот мы обнаружили, что ВВ содержат РНК, в том числе фракцию малых РНК.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение профиля экспрессии микроРНК в полученных везикулах и их влияния на уровень экспрессии генов в клетках-мишенях.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00186.

Источники и литература

- 1) György B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cel and Mol Life Sci* 2011 May, 68(16), 2667–2688.

- 2) Quail D. F. et al. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 2013 Nov;19(11):1423-37.
- 3) Rysenkova K.D. et al. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation. Oncotarget. 2018. Vol. 9, No 50. P. 29414-29430